

인체폐암세포의 성장에 미치는 葦莖湯의 영향에 관한 연구

최해윤 · 박 철² · 최영현² · 박동일^{1*}

대구한의대학교 포항한방병원, 동의대학교 한의과대학 1: 내과학교실, 2: 생화학교실 및 한의학연구소

Induction of Cdk Inhibitor p21 and Inhibition of hTERT Expression by the Aqueous Extract of *Wikyung-tang* in Human Lung Carcinoma Cells

Hae-Yun Choi, Cheol Park¹, Yung Hyun Choi¹, Dong Il Park^{1*}

Pohang Oriental Hospital of Daegu Haany University, 1: Department of Internal Medicine, 2: Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine and Research Institute of Oriental Medicine

In the present study, we investigated the anti-proliferative effects of aqueous extract of *Wikyung-tang*(WKT) on the growth of human lung carcinoma cell line A549. WKT treatment declined the cell viability and proliferation of A549 cells in a concentration-dependent manner. The anti-proliferative effects by WKT treatment in A549 cells was associated with morphological changes such as membrane shrinking and cell rounding up. WKT treatment induced an inhibition and/or degradation of apoptotic target proteins such poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1). WKT treatment did not affect the levels of other Bcl-2 family gene products, such as Bcl-2, Bax and Bad. Western blot analysis and RT-PCR data revealed that the levels of tumor suppressor p53 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21 were induced by WKT treatment in A549 cells. Additionally, WKT treatment induced the down-regulation of telomerase reverse transcriptase mRNA (hTERT) expression of A549 cells, however, the levels of other telomere-regulatory gene products were not affected. Taken together, these findings suggest that WKT-induced inhibition of human lung cancer cell proliferation is associated with the induction of apoptotic cell death via regulation of several major growth regulatory gene products and WKT may have therapeutic potential in human lung cancer.

Key words : *Wikyung-tang*(葦莖湯), PARP, PLC- γ 1, p53, p21, hTERT

서 론

Apoptosis (programmed cell death)는 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체방어기전이란 점에서 necrosis와 구별된다^{1,2)}. 또한 apoptosis는 개체보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 정상적인 세포주기의 이탈은 apoptosis의 주원인이 될 수 있다^{3,4)}. Apoptosis의 유발에 종양억제 유전자 p53이나, Bcl-2 family에 속하는 Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있는데, Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 반면, Bax는 과발현되었을 때 apoptosis를 유도한다⁵⁾. 두 단백질은

서로 dimer를 형성하면서 cytochrome c와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들의 조절에 관여한다. 특히 DNA 손상에 의한 p53의 유도는 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor인 p21과 연관되어 세포주기 상 G1기에서의 세포증식 억제뿐만 아니라 Bax 유전자를 활성화시키고 Bcl-2의 발현을 억제하면서 apoptosis에도 관여하는 것으로 알려지고 있다^{6,7)}. 세포 내·외의 신호전달에 의한 상대적인 Bcl-2 member 발현의 증가는 caspase의 활성을 촉진하며, 활성화된 caspase는 직·간접적으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다. 또한 caspase의 활성은 inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), 전사 조절인자인 nuclear factor kappa B (NF- κ B) 등에 의해서도 직·간접적으로도 조절될 수 있다.

한편 세포주기 조절은 각 주기별 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 양성 조절인자인 cyclins에 의하여 Cdk의 연속적

* 교신저자 : 박동일, 부산시 진구 양정동 산 45-1, 동의대학교 한의과대학

· E-mail : dipark@deu.ac.kr, Tel : 051-850-8650

· 접수 : 2004/02/07 · 수정 : 2004/03/11 · 채택 : 2004/04/03

인 활성화와 불활성이 결정되어진다⁸⁻¹⁰. 먼저 Cdk4 및 Cdk6와 복합체를 이루는 D-type cyclin은 G1기의 조절에 중요하며^{11,12}, cyclin E는 Cdk2와 복합체를 이루면서 S기로의 전이에 중요한 역할을 담당하고 있다^{13,14}. 특히 D-type cyclins는 retinoblastoma 단백질의 인산화 조절과 이로 인한 G1/S 전이 및 DNA 합성 조절에 중요한 전사인자 E2Fs의 활성을 조절한다^{9,10,15}. Cyclin A는 G1 후기에 발현을 시작하여 S기와 G2기 동안 발현이 증가되며 cyclin B1은 G2기에서 M기로의 전이를 조절하며, 각각은 Cdk2 및 Cdc2의 kinase 활성을 위한 양성 조절자로서 중요한 역할을 한다¹⁶⁻¹⁹. 한편 Cdk는 다양한 세포증식 억제 신호에 의해 유도되는 Cdk inhibitor에 의하여 그 활성이 억제되어지는데, 크게 두 가지의 family로 분류 (INK4 및 CIP/KIP family)되어지고 있다^{20,21}). 이들 중 Cdk2와 결합하면서 그들의 활성을 저해하는 것으로 알려진 CIP/KIP family에 속하는 p21은 DNA 손상에 의한 중앙 억제인자 p53에 의해 조절을 받으며^{21,22}, 이는 세포주기 상 G1기를 포함하여 세포증식을 억제하는 가장 중요한 조절인자로 알려져 왔다^{6,8,23}.

한편 노화의 개념에서 매우 중요하게 인식되어지고 있는 telomerase는 진핵세포 염색체의 말단에 존재하는 telomere의 조절에 관여하는 효소로서 정상세포에 비하여 암세포에서 발현 및 활성이 매우 높은 상태로 유지되고 있다^{24,25}. 즉 암세포에서 높은 활성을 지니는 telomerase의 활성을 선택적으로 억제함으로써 암세포의 성장과 분열을 억제하고자하는 시도 역시 신개념의 항암제 개발을 위한 표적이 되고 있다.

최근 우리나라의 폐암에 의한 사망률이 인구 10만 명당 25명으로 암 중 가장 높은 사망률을 보여주고 있으며 앞으로도 꾸준한 상승이 예상되고 있다²⁶. 한의학에서 임상적으로 폐암은 肺癰證과 유사한 범주에 속하고²⁷, 葦莖湯은 《外臺秘要》, 《備急千金要方》에서 폐옹에 사용되는 처방으로 기재되어 있으며^{28,29}, 폐옹증의 치료에 있어서 釀成期和 潰膿期에 葦莖湯을 선용하여 폐암의 치료에 활용 가능한 처방으로 인식되고 있다²⁷. 葦莖湯의 효능에 대한 연구로는 박 등³⁰이 항종양효과를 살펴본 바는 있으나 분자생물학적인 실험을 통해 그 효능을 살펴 본 예는 없었다. 이에 본 연구에서는 葦莖湯이 인체 폐암세포의 증식에 미치는 분자생물학적 영향을 알아보기 위하여 葦莖湯 수용액 추출물의 처리농도에 따른 폐암세포의 성장을 억제, 이로 인한 형태적 변화 및 단백질 발현을 관찰하고 apoptosis 및 세포주기 조절과의 연관성을 가지는 유전자 산물의 발현 및 변화를 관찰한 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료준비

본 실험에 사용된 약재는 동의대학교 부속 한방병원에서 구입(주, 광명제약)하여 정선한 후 사용하였다. 처방의 내용은 方劑學에 준하였으며³¹, 그 조성은 Table 1에 나타난 바와 같다. 葦莖湯의 수용액 추출물(WKT, aqueous extract of Wikyung-tang)을 얻기 위하여 약재 1 g당 증류수 1 mL을 가하여 환류 냉각장치가

장착된 가열기에서 180~200℃의 온도로 2시간 동안 끓이고, 이를 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 시킨 후, 그 상층액을 Whatman 필터 (No. 2)로 걸러내고 감압 농축과 가열을 통해 고형성분을 얻어내어 막자사발로 잘게 마쇄하고 밀봉시켜 초저온 냉동고에 보관하였다.

Table 1. Composition of Wikyung-tang

韓藥名	學名 (Scientific name)	用量 (Weight, g)
葦莖	<i>Phragmites Rhizoma</i>	30
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	30
冬瓜仁	<i>Benincasae Semen</i>	24
桃仁	<i>Persicae Semen</i>	9
Total amount		93

2. 암세포주 및 배양조건

실험에 사용한 A549 인체 폐암세포 (human lung carcinoma cells)는 생명공학연구소 (KRIBB, Daejeon, Korea)에서 분주 받아 사용하였으며, 암세포의 배양을 위해 90%의 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 배양하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였으며, 성장배지의 교환은 매 48시간마다 해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포배양용 페트리 접시로 옮겨 배양하였다.

3. 약제의 처리

葦莖湯 추출물의 처리를 위해 세포를 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 부유시킨 다음 1 × 10⁵개/mL 정도로 세포배양용 페트리 접시에 분주하여 24시간 동안 안정화 시켰다. 세포에 처리하기 직전 葦莖湯 추출물을 적정 농도로 성장배지에 첨가하여 녹인 다음, 0.22 μm의 pore size를 가진 주사기용 필터유닛을 사용하거나 1회용 펌프 필터 유닛을 사용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 다음, 세포의 성장배지를 갈아주면서 직접 처리하였다.

4. MTT assay를 이용한 세포 성장의 측정

세포배양용 96 well plate에 폐암세포 2 × 10⁴개/mL로 희석한 세포액을 100 μL/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 葦莖湯 추출물을 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 0.5 mg/mL 농도로 희석하여 200 μL씩 분주하고 3시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 100 μL씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Ins.)으로 구하였다.

5. 위상차 현미경을 이용한 세포형태의 관찰

세포배양용 페트리 접시에 A549 폐암세포를 6×10^5 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 薑蓐湯 추출물을 희석 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 위상차 현미경 (inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 다음 Kodak 자동 카메라 용 필름을 이용하여 사진을 촬영하였다.

6. SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 Western blot analysis

세포배양용 페트리 접시에 6×10^5 개/ml 정도로 폐암세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 薑蓐湯 추출물을 처리하였다. 48시간까지 배양한 후, 세포를 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer (250 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM ethylenediamine-tetraacetic acid : EDTA pH 8.0, 1% NP-40, 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride ; PMSF, 1 M 1,4-dithio-DL-threitol ; DTT, protease inhibitor cocktail, DW)를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 13,500 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 동량으로 맞춘 다음 동량의 Laemmli sample buffer (β -mercaptoethanol 5%, Laemmli sample buffer 95%, Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 sample 동량을 sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다.

Western blot analysis를 위하여 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 2시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분 정도 세척하였다. 세척 후 1차 항체 (PBS-T로 1:500 또는 1:1000으로 희석하여 사용)를 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4°C에서 over night시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체 (PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현 양상을 비교 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

7. RT-PCR을 이용한 RNA 발현의 분석

정상 및 薑蓐湯 추출물이 들어 있는 배지에서 48시간 동안 자란 암세포를 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하

여 부유시킨 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상층액을 버리고 세포만 모았다. 24시간 후 세포를 disposable cell lifter (Fisher scientific)로 암세포를 모아 50 ml tube에 옮긴 후 1,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하였다. Pellet에 PBS를 첨가하여 현탁한 다음 1,000 rpm에서 5분간 원심분리를 한 후 pellet에 RNazol B 1 ml을 첨가하여 약하게 현탁을 하고 e-tube에 옮겨서 4°C에서 1시간 동안 세포를 용해시켰다. 여기에 chloroform 200 μ l를 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4°C에서 5분 동안 방치시켰다. 이를 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 (4°C)하여 무색의 상층액만을 400 μ l 취한 뒤 동량의 isopropanol을 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4°C에서 15분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 (4°C)하여 얻은 pellet (RNA)에 75% ethanol (25% DEPC treated water, Nalgene) 500 μ l를 넣어 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 (4°C)하고 ethanol을 완전히 날린 후에 DEPC water 50 μ l를 넣어서 RNA를 용해하여 A260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 함량을 계산하였다. 분리한 RNA에 oligo dT primer와 DEPC water를 넣고 65°C에서 10분 동안 반응시킨 후 실온에서 3분 동안 방치한 다음 10 \times buffer, 10 mM dNTP, RNasin, AMV Reverse transcriptase, 50mM MgCl₂ 및 DEPC treated water를 넣고 42°C에서 1시간 동안 반응시켜서 reverse transcriptase (RT) product를 만들었다. 만들어진 RT product (template cDNA)에 2.5 mM dNTP, 10 \times buffer, DEPC water, premixed primer (GenoTech, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 polymerase chain reaction (PCR)을 행하였다. 또 ONE-STEP RT-PCR PreMix (iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 실험하였을 경우에는 분리한 RNA에 iNtRON ONE-STEP RT-PCR PreMix, premixed primer 및 DEPC treated water를 넣고 RT-PCR을 행하였다. PCR을 행하여 만들어진 DNA의 양을 확인하기 위하여 1 \times TAE buffer으로 1% agarose gel을 만들고 well에 각각의 primer (Table 2)에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution (5 \times , QUALITY BIOLOGICAL, INC.)을 섞어서 loading한 후 100 V에서 전기영동을 하여 Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영을 하였다.

Table 2. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name	Sequence	
hTERT1	Sence	5'-AGC-CAG-TCT-CAC-CTT-CAA-CC-3'
	Antisence	5'-GTT-CTT-CCA-AAC-TTG-CTG-ATG-3'
TEP-12	Sence	5'-TCA-AGC-CAA-ACC-TGA-ATC-TGA-G-3'
	Antisence	5'-CCC-CGA-GTG-AAT-CIT-TCT-ACG-C-3'
hTR3	Sence	5'-TCT-AAC-CCT-AAC-TGA-GAA-GGG-CGT-AG-3'
	Antisence	5'-GTT-TGC-TCT-AGA-ATG-AAC-GGT-GGA-AG-3'
c-myc	Sence	5'-AAG-ACT-CCA-GCG-CCT-TCT-CTC-3'
	Antisence	5'-GTT-TTC-CAA-CTC-CGG-GAT-CTG-3'
p53	Sence	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisence	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	Sence	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisence	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
GAPDH4	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

¹telomerase reverse transcriptase, ²telomerase-associated protein, ³telomeric repeat binding factor, ⁴glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

결과 및 고찰

1. 인체 폐암세포의 증식에 미치는 葦蕒湯의 영향

준비된 葦蕒湯 시료를 인체 폐암세포 A549에 48시간 동안 처리한 후, MTT assay법에 준하여 葦蕒湯 처리에 의한 폐암세포의 세포증식 억제 정도를 조사하였다^{32,33}. 실험방법에 서술한 것처럼 48시간 동안 葦蕒湯 추출물이 처리된 A549 세포를 대상으로 ELISA reader를 이용하여 얻은 흡광도 결과는 Fig. 1A와 같다. Fig. 1A에서 알 수 있듯이 1 mg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 흡광도가 약 30% 정도 감소되었으며, 葦蕒湯 추출물의 처리 농도가 증가될수록 흡광도는 더욱 감소되어 3 mg/ml 처리군에서는 50% 이하로 떨어졌다. 이상의 결과들에서 葦蕒湯이 처리된 배지에서 자란 암세포는 葦蕒湯의 처리농도 의존적으로 모두 정상적인 세포증식이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다.

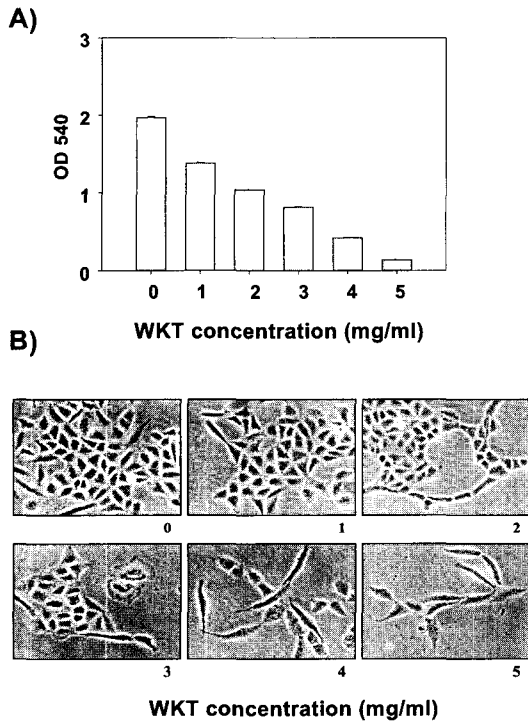


Fig. 1. (A) Effect of WKT on the cell proliferation in A549 human lung carcinoma cells. Cells were seeded as described in materials and methods, and treated with various concentrations of WKT. After 48 h incubation with WKT, MTT assay was performed. Results are expressed as average from two separate experiments. (B) Morphological changes in A549 human lung carcinoma cells following incubation with WKT. Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (0) or WKT for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, $\times 200$.

2. 인체 폐암세포의 형태 변형에 미치는 葦蕒湯의 영향

葦蕒湯 추출물의 처리에 따른 암세포의 증식 억제에 따른 암세포의 형태 변화 관찰을 위하여 다양한 농도 범위로 葦蕒湯 추출물을 48시간 동안 처리한 후 위상차 현미경을 이용하여 정상 및 葦蕒湯 추출물이 처리된 조건에서 배양된 암세포의 모양을 관찰하였다. Fig. 1B에서 볼 수 있듯이 葦蕒湯 추출물의 농도 증가에 따른 세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 처리된 葦蕒湯 추출물의 농도가 증가될수록 전체적으로 세포질이 응축되면서 세포의 모양이 길어지면서 돌기와 같은 형태가 분지를

이루기 시작하였고, 고농도 처리군에서는 많은 암세포들이 부착 능력이 상실되어 배지위로 부유하기 시작하였으며 배양 접시에 부착된 세포들도 심한 형태적 변이를 수반하였다. 특히 고농도 처리군에서 배양된 세포들은 신경세포에서 볼 수 있는 dendrite-like한 형태적 변화가 특이적으로 관찰되었으며, 이러한 결과는 葦蕒湯 처리에 의한 암세포의 부착 능력 상실 및 암세포의 분화 (differentiation)가 수반되었을 가능성을 의미하는 것으로 사료된다. 아울러 암세포의 형태적 변형 및 부착 능력 상실 등의 정도는 葦蕒湯 추출물 처리에 따른 암세포의 생존율 감소 및 성장억제와 잘 일치되는 결과였다.

3. PARP, β -catenin 및 PLC- γ 1의 발현에 미치는 葦蕒湯의 영향

이상의 결과들에서 葦蕒湯에 의한 인체 폐암세포의 성장억제는 apoptosis의 유발과 관련이 있을 것으로 추정되어 apoptosis 유발 시 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 표적 단백질의 발현에 미치는 葦蕒湯 추출물의 영향을 Western blot analysis 방법으로 조사하였다. 먼저 조사된 Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 단백질은 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하며³⁴, apoptosis 유발과정 중 활성화된 caspase에 의하여 단백질의 분해가 일어나면 PARP의 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어진다^{7,35}. 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편이 관찰되거나 주 band의 발현이 감소된다^{35,36}. 따라서 葦蕒湯의 처리에 의한 성장억제 과정에서도 이러한 현상이 관찰되는지의 여부를 조사하기 위하여 다양한 농도의 葦蕒湯 추출물이 함유된 배지에서 48시간 배양된 세포들을 모아 동량의 단백질을 8% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동하여 분리시킨 후 nitrocellulose membrane으로 전이 시켜 PARP 항체를 이용하여 Western blotting을 실시하였다. Fig. 2A에서 볼 수 있는 바와 같이 정상 배지에서 배양된 세포들의 경우 116 kDa 위치에 강한 주 band를 볼 수 있었다. 葦蕒湯 추출물이 처리된 세포에서 85 kDa의 band가 관찰되지는 않았으나 처리 농도가 증가될수록 주 band의 발현이 매우 감소되었음을 알 수 있었다. 즉 葦蕒湯의 처리에 의한 apoptosis 과정에 PARP 단백질이 현저하게 감소되었음을 알 수 있었다.

Catenin family에 속하는 단백질(α , β 및 γ)은 모든 세포에서 발현되는 세포질 단백질로서 E-cadherin과 결합하여 세포 연결 기능에 중요한 역할을 한다^{37,38}. 특히 β -catenin은 세포내 골격의 유지와 다양한 부착성 세포의 전사 조절에 중요하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있다^{38,39}. 정상 세포의 경우 β -catenin은 92 kDa의 분자량을 가지나 세포 유착성 apoptosis (adherent cell apoptosis)가 일어나면 62-72 kDa로 단편화가 일어난다⁴⁰⁻⁴². 葦蕒湯의 처리에 의한 β -catenin 발현을 조사하였으나 Fig. 2A에서 보는 바와 같이 시간 경과에 따른 β -catenin의 발현에 葦蕒湯 추출물은 아무런 영향을 미치지 못하였다. 葦蕒湯이 처리된 세포들의 형태 관찰에서 葦蕒湯 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포들의 부착 능력을 상실하여 많은 세포들

이 부유되었음에도 불구하고 β -catenin 단백질 발현의 변화가 없는 것은 흥미로운 결과이나 cadherin 단백질들과의 결합력은 떨어질 것으로 예상되므로 세포 부착과 연관된 단백질들의 kinase 활성도 및 상호 결합과 관계된 추가적인 연구가 요구되어진다.

최근 연구에 의하면 epidermal growth factor, transforming growth factor, insulin-like growth factor-1 및 cytokine 등과 같은 세포 성장을 촉진하는 인자들이 apoptosis를 억제할 수 있는 것으로 보고 되어지고 있다. 이들 성장인자의 수용체들은 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), G-protein 및 phospholipase C- γ (PLC- γ 1) 등과 같은 주요 신호전달 분자들을 활성화시킬 수 있다. PI3K에 의해 생산되는 phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate (PIP3)는 protein kinase B (PKB)/Akt 및 PLC- γ 1을 활성화시킨다. 특히 PLC- γ 1은 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate를 hydrolyze시켜 protein kinase C (PKC) activator인 diacylglycerol 및 세포 내 Ca^{2+} 조절에 중요한 역할을 하는 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)를 생산한다⁴³⁾. 따라서 PI3K나 Ras와 같은 세포성장 신호분자와 같이 PLC- γ 1 역시 세포의 증식에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁴⁴⁾. 그러나 apoptosis가 유발될 경우 활성화된 caspase 효소에 의하여 PLC- γ 1 단백질은 분해될 수 있기 때문에 상기 두 종류의 단백질과 함께 apoptosis 유발의 생화학적 표식자로 사용이 가능하다^{45,46)}. 따라서 葎蓍湯 추출물의 처리에 의한 apoptosis 유발과정에서 PLC- γ 1 단백질의 분해가 관여하지는의 여부를 조사하였다. Fig. 2A에 나타내었듯이 葎蓍湯 추출물의 처리 농도가 증가될수록 PLC- γ 1의 발현은 매우 빨리 감소되었음을 알 수 있었으며, 처리 농도 증가에 따른 발현의 감소 정도는 PARP와 매우 유사하였다.

4. Bcl-2 family의 발현에 미치는 葎蓍湯의 영향

상기의 결과들에서 알 수 있듯이 葎蓍湯 추출물이 함유된 배지에서 자란 폐암세포의 성장 억제는 PARP 및 PLC- γ 1 단백질의 분해와 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 葎蓍湯 추출물의 처리에 의한 apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 apoptosis와 연관성을 가지는 몇 가지 유전자 산물들의 발현을 조사하였다. 그중 Bcl-2 family의 대표적 유전자인 Bcl-2 member에 속하는 유전자 산물들은 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax member에 속하는 인자들은 pro-apoptotic 분자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다⁵⁾. 이들은 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제 유전자인 p53, cysteine-related protease인 caspase, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다^{5,47,48)}. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다^{48,49)}. 따라서 葎蓍湯 추출물의 처리에 의한 폐암세포의 apoptosis 유발이 Bcl-2 family의 발현변화에 의한 것인지를 조사하기 위하여 Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 유전자들의 단백질 발현에 미치는 葎蓍湯 추출물의 영향을 조사하였다. Fig. 2B에서 볼 수 있듯이 조사된 4 가지 Bcl-2 family 유전자들의 단백질 발현에는 葎蓍湯의 처리에 따른 큰 차

이점을 관찰할 수 없었다.

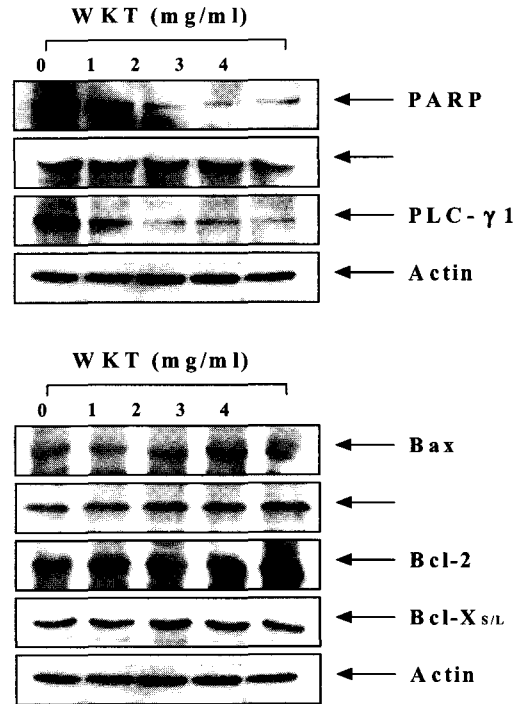


Fig. 2. (A) Degradation of PARP and PLC- γ 1 by WKT treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with WKT for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 8-12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system; (B) Effects of WKT treatment on the levels of Bcl-2 family proteins in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with WKT for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 12 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

5. p53 및 p21의 발현에 미치는 葎蓍湯의 영향

葎蓍湯 추출물의 처리에 의한 폐암세포의 증식억제가 종양 억제 유전자 또는 세포주기 조절 억제자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 Cdk inhibitor 중 가장 많은 연구가 이루어졌으며, G1기에서 S기로 전이에 중요한 역할을 하는 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 전사 및 번역수준에서의 발현을 RT-PCR 및 Western blotting으로 조사하였다. Fig. 3A의 결과에서 볼 수 있듯이 비록 RT-PCR의 결과에서 종양 억제 유전자 p53 mRNA 및 단백질의 발현이 다소 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 3B). 그리고 p21의 경우도 mRNA 및 단백질 발현 모두에서 葎蓍湯의 처리 농도의 존적으로 현저하게 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 3). 특히 Cdk inhibitor인 p21은 p53의 발현 증가에 의하여 전사 수준이 조절될 수 있으며^{6,7,21,23)}, 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절인자란 점에서 葎蓍湯 추출물의 처리에 의한 발현의 증가는 매우 의미있는 결과라고 추측되어진다^{1,20,50)}. 그러나 본 연구의 결과만으로 葎蓍湯에 의한 폐암세포의 세포주기 교란에 관한 명확한 증거는 제시할 수 없으며, 세포주기 분석과 관련 유전자들의 kinase 활성도 검사 등을 통한 후속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

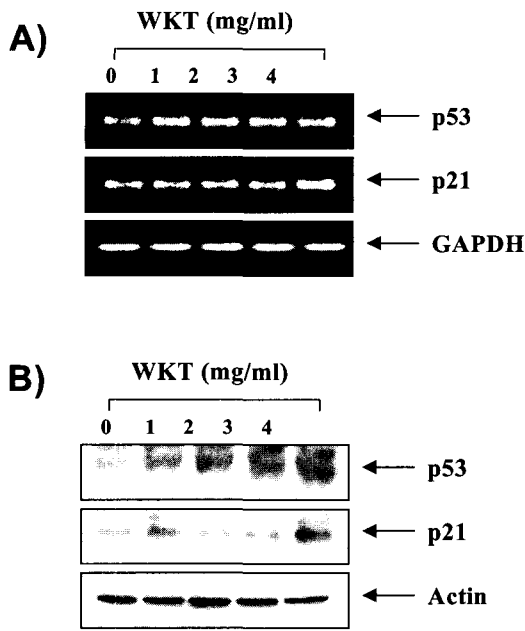


Fig. 3. Effects of WKT treatment on the levels of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitor p21 mRNA and protein in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with WKT for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using p53 and p21 primers described in materials and methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with WKT for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-p53 and anti-p21 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

6. Telomerase 관련 조절인자의 발현에 미치는 葦蕒湯의 영향

Telomere는 염색체의 말단 부위에 repeat sequences (TTAGGG)로 이루어져 있으며, 이런 반복구조의 형성 및 유지에 관여하는 효소가 telomerase이다^{25,51}. 정상 체세포에서는 telomerase의 활성이 없기 때문에 세포가 분열할수록 telomere의 길이는 짧아지게 되지만, 암세포의 90% 이상에서는 telomerase의 catalytic subunit 단백질을 coding하는 hTERT가 과발현되어 있고 이로 인한 높은 telomerase의 활성을 나타내고 있다. 따라서 노화, 혈관신생 및 면역계질환 등에서 뿐 만 아니라 암의 발생과 진행도 이들과 밀접한 연관성이 있으며, 암의 진단과 진행의 정도를 나타내는 지표로 사용될 수 있음을 시사하여 준다^{24,29}. 노화의 개념에서 결국 telomere의 소실은 염색체의 안정성이 상실되는 것이며 이는 DNA damaging agent에 의한 p53 및 coactivator p300 의존적인 p21의 발현증가로 인한 cell cycle arrest 유발로 설명되어지고 있다^{51,52}. 특히 암과 연관된 부분에서 telomerase의 활성은 hTERT 유전자의 발현 조절에 의한 것이고, hTERT 유전자의 promoter 부위에는 다른 유전자의 promoter 보다 훨씬 더 많은 전사조절인자의 결합부위를 보유하고 있어 activator 또는 repressor로 작용할 수 있다^{25,53}. 이러한 중요성을 고려하여 葦蕒湯의 처리에 의한 폐암세포의 증식 억제가 폐암세포 염색체 말단에 존재하는 telomere의 조절과 어떤 관계가 있는지를 조사하였다. Fig. 4의 결과에서 알 수 있듯이 葦蕒湯 추출물의 처리에 의하여 hTERT 유전자의 전사수준이 매우 유의적으로 감소되었으며, 또 다른 조절인자인 TEP-1이 다소 감소되었다. 이러한 감소 경향성은 Fig. 8에서 관찰한 바 있는 p53

및 p21의 발현 증가와 상반되는 결과로서 葦蕒湯 추출물의 처리에 의한 폐암세포의 증식억제는 telomerase 활성 감소가 최소한 관여할 수 있음을 알 수 있었다.

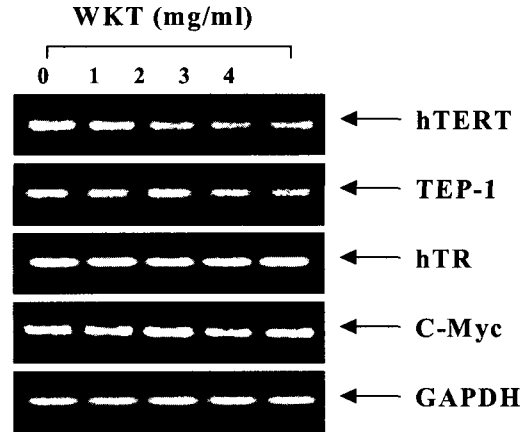


Fig. 4. Down-regulation of hTERT mRNA by WKT treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with various concentrations of WKT. After 48 h incubation, total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers described in materials and methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

결론

葦蕒湯 수용액 추출물이 인체 폐암세포주 A549 세포의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다. 葦蕒湯 추출물의 처리 농도 의존적으로 A549 폐암세포의 성장률은 현저하게 감소되었으며, 이러한 암세포 증식억제 효과는 암세포의 심한 형태적 손상에 의한 부착력 상실과 연관이 있었다. 葦蕒湯 추출물에 의한 폐암세포의 증식억제는 apoptosis 유발과 연관이 있었으며, 전형적인 apoptosis에 의한 세포사에서 관찰되는 PARP 및 PLC-γ1 단백질의 발현저하 및 분해 현상도 관찰할 수 있었다. 葦蕒湯 추출물은 apoptosis 억제에 관여하는 Bcl-2 family 유전자들의 단백질 발현에는 큰 차이점을 관찰할 수 없었다. 그러나 葦蕒湯 추출물의 처리에 의한 폐암세포의 증식억제 효과는 세포주기 조절인자 중 증양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 전사 및 번역 수준에서 모두 발현 증가를 가져왔다. 葦蕒湯 추출물의 처리에 의한 폐암세포의 증식억제는 telomere 조절인자 중 telomerase mRNA 발현의 선택적 억제와 연관성이 있었다. 따라서 葦蕒湯 추출물 처리에 의한 A549 인체 폐암세포의 성장억제는 세포주기 조절, apoptosis의 유발 및 세포증식 조절과 연관된 주요한 몇 가지 유전자들만을 선택적으로 조절함으로써 암세포의 성장을 막고 생존율을 감소시키면서 apoptosis를 유발할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Evans, V.G. Multiple pathways to apoptosis. Cell Biol. Int. 17, 461-476, 1993.
2. Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H. Apoptosis. The role

- of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136, 593-608, 1990.
3. Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W., Greenberg, A.H. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 263, 1143-1145, 1994.
 4. Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D.A., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Jr. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 9, 3743-3751, 1994.
 5. Chiarugi, V., Magnelli, L., Basi, G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, 603-612, 1994.
 6. El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., Wiman, K.G., Mercer, W.E., Kastan, M.B., Kohn, K.W., Elledge, S.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54, 1169-1174, 1994.
 7. Miyashita, T., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299, 1995.
 8. Choi, Y.H. and Choi, H.J. Significance of cell cycle and checkpoint control. *Kor. J. Life Sci.* 11, 362-370, 2001.
 9. Sherr, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 60, 3689-3695, 2000.
 10. Weinberg, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330, 1995.
 11. Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., Kato, J.Y. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 14:2066-2076, 1994.
 12. Meyerson, M., Harlow, E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2077-2086, 1994.
 13. Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R., Roberts, J.M. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257, 1689-1694, 1992.
 14. Ohtsubo, M., Roberts, J.M. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259, 1908-1912, 1993.
 15. Sherr, C.J. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-1065, 1993.
 16. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., Lamb, N.J. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67, 1169-1179, 1991.
 17. Guadagno, T.M., Ohtsubo, M., Roberts, J.M., Assoian, R.K. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science* 262:1572-1575, 1993.
 18. Walker, D.H., Maller, J.L. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* 354, 314-317, 1991.
 19. Brandeis, M., Hunt, T. The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO J.* 15, 5280-5289 1996.
 20. Elledge, S.J., Harper, J.W. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 847-852, 1994.
 21. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816, 1993.
 22. Gu, Y., Turck, C.W., Morgan, D.O. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366, 707-710, 1993.
 23. Xiong, Y., Hannon, G., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704, 1993.
 24. Kyo, S., Inoue, M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy. *Oncogene* 21:688-697, 2002.
 25. Poole, J. C., Andrews, L. G. and Tollefsbol, T. O. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 269, 1-12, 2001.
 26. 통계청. 2001년 사망원인통계결과, 2002, p. 11.
 27. 全國韓醫科大學 肺系內科學教室, 東醫肺系內科學, 서울, 훈문회사, 2002, p. 79.
 28. 王燾. 外臺秘要. 台北:文光圖書有限公司, 1979:285-286.
 29. 孫思邈. 備急千金要方, 서울, 大星文化社, 1984, p. 316.
 30. 박경식, 박정휘, 김동희, 김성훈. 葦莖湯·加味葦莖湯의 A549에 대한 세포독성과 S-180에 대한 항암효과. *동의병리학회지* 10, 217-245, 1995.
 31. 김상찬, 김선희, 노승현, 박선동, 변승희, 서부일, 서영배, 이상인, 이강희, 주영승, 최호영. *方劑學*, 서울, 永林社, 1999, p. 607-608.
 32. Kratzke, R. A. and Kramer, B. S., Evaluation of in vitro chemosensitivity using human lung cancer cell lines. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 24, 160-164, 1996.
 33. Smit, H.F., Woerdenbag, H.J., Singh, R.H., Meulenbeld, G.J., Labadie, R.P., Zwaving, J.H. Ayurvedic herbal drugs with possible cytostatic activity. *J. Ethnopharmacol.* 47:75-84, 1995.
 34. Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. Yama/ CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809, 1995.
 35. Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., Poirier, G.G. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 3976-3985, 1993.
 36. Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier,

- G.G., Earnshaw, W.C. Cleavage of poly ADP-ribose polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347, 1994.
37. Johnson, J.P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis. Rev.* 18, 345-357, 1999.
 38. Wijnhoven, B.P., Dinjens, W.N., Pignatelli, M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.* 87, 992-1005, 2000.
 39. Debruyne, P., Vermeulen, S., Mareel, M. The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta. Gastroenterol. Belg.* 62, 393-402, 1999.
 40. Choi, Y.H., Bae, J.H., Yoo, M.A., Chung, H.Y., Kim, N.D., Kim, K.W. Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* 17:565-571, 2000.
 41. Fukuda, K. Apoptosis-associated cleavage of β -catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31, 519-529, 1999.
 42. Steinhilber, U., Badock, V., Bauer, A., Behrens, J., Wittman-Liebold, B., Dorken, B., Bommert, K. Apoptosis-induced cleavage of β -catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J. Biol. Chem.* 275, 16345-16353, 2000.
 43. Rhee, S.G., Suh, P.G., Ryu, S.H. and Lee, S.Y. Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* 244, 546-550, 1989.
 44. Chang, J.S., Noh, D.Y., Park, I.A., Kim, M.J., Song, H., Ryu, S.H., Suh, P.G. Overexpression of phospholipase C-1 in rat 3Y1 fibroblast cells leads to malignant transformation. *Cancer Res.* 57, 5465-5468, 1997.
 45. Bae, S.S., Perry, D.K., Oh, Y.S., Choi, J.H., Galadari, S.H., Ghayur, T., Ryu, S.H., Hannun, Y.A., Suh, P.G. Proteolytic cleavage of phospholipase C-gamma1 during apoptosis in Molt-4 cells. *FASEB J.* 14, 1083-1092, 2000.
 46. Myklebust, J.H., Blomhoff, H.K., Rusten, L.S., Stokke, T., Smeland, E.B. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 30, 990-1000, 2002.
 47. Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T. and Housman, D.E. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 957-967, 1993.
 48. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499, 1998.
 49. Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Millman, C.L., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251, 1993.
 50. Morgan, D.O. Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134, 1995.
 51. Vaziri, H., West, M.D., Allsopp, R.C., Davison, T.S., Wu, Y.S., Arrowsmith, C.H., Poirier, G.G., Benchimol, S. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J.* 16, 6018-6033, 1997.
 52. Narayan, S., Jaiswal, A.S., Multani, A.S., Pathak, S. DNA damage-induced cell cycle checkpoints involve both p53-dependent and -independent pathways: role of telomere repeat binding factor 2. *Br. J. Cancer* 85:898-901, 2001.
 53. Cerni, C. Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutat. Res.* 462, 31-47, 2000.